チェックカラーヒスタミンの操作方法が簡易になりました。
キット内容の変更はございませんので、
従来の操作方法でもこれまで通り測定できます。

チェックカラーヒスタミン取扱い説明書変更のお知らせ

この度、チェックカラーヒスタミンは、操作方法の変更に伴い、キット同梱の取扱い説明書を改訂させていただいております。

従来の操作法では、**「2 本のピペットを使い分けた 20 回の操作」**が必要でしたが、新操作法では、**「1 本のピペットで 12 回の操作」**と、一層簡便になりましたのでお試し下さい。

なお、キットの構成、成分の変更はございません。従来の操作方法でも、これまで通り測定できます。旧取扱い説明書が必要な場合には、弊社ホームページチェックカラーヒスタミン製品情報からダウンロードすることができます。(ブラウザ検索⇒チェックカラーヒスタミン)(http://biochemifa.kikkoman.co.jp/products/kit/histamine/products.html)

変 更 点

赤太字:新取扱い説明書 **(かっこ内太字:旧取扱い説明書)**

1 ページ [測定に使用する推奨機器]

分光光度計*4(470 nm 付近が測定できるもの)

***4 光路 1cm の吸光度計の場合マイクロセルをご使用ください。**

2 ページ [測定] 2.試薬の調整 (発色試薬液) 3 行目

・・・発色試薬 1 瓶に **11 mL の蒸留水**(**9 mL の蒸留水**)を加え、・・(略)・・溶解して下さい。

2 ページ [測定] 2.試薬の調整 (酵素液) 3 行目

・・・酵素 1 瓶に **6 mL の緩衝液**(**5 mL の蒸留水**)を加え、・・(略)・・溶解して下さい。

2 ページ [測定] 3.測定 5)標準値 3 行目

Estd 値は吸光度計 B を使用した場合 **0.85 前後**(**0.8±0.1**)を示します。(セル幅 1 cm の吸光度計の場合 **0.5 前後**(**0.45±0.1**)となります。)

2 ページ [測定] 測定操作 表

添加操作は、**0.5mL で 12 回**(**1.0mL、0.4mL を使い分け 20 回**)のピペット操作

お問い合わせ先:
キッコーマンバイオケミファ株式会社
〒105-0003 東京都港区西新橋 2-1-1
TEL 03-5521-5490　FAX 03-5521-5498
E-mail:biochemifa@mail.kikkoman.co.jp

kikkoman

ヒスタミン測定キット

「チェックカラー ヒスタミン」取扱い説明書

商品コード:60441

注意!

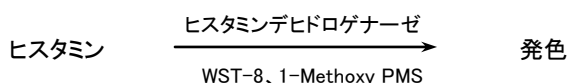
1. キット中の試薬を飲んだり、素手で触れたり、目に入れたりしないで下さい。
2. 取扱い説明書の使用上の注意および取扱い上の注意に従って取扱って下さい。

〔用途〕

ヒスタミンは、マグロ、カツオ、サバ、イワシなどの魚介類の腐敗過程で多く生成します。ヒスタミンを高濃度に含むこれらの食品を摂取した場合、アレルギー様の食中毒を起こすことがあります。このため、ヒスタミンは魚介類の衛生管理において特に注意しなければならない物質となっています。

本キットは、分光光度計等を用いる生魚(生鮮および冷凍魚肉)のヒスタミンの測定に使用します。このキットは、上記の測定以外の目的では使用しないで下さい。本測定法は、自主衛生検査用です。公定法ではありません。

〔測定原理〕

ヒスタミン ——ヒスタミンデヒドロゲナーゼ / WST-8、1-Methoxy PMS——→ 発色

ヒスタミンは 1-Methoxy PMS*1、テトラゾリウム塩(WST-8*2)の存在下、ヒスタミンデヒドロゲナーゼを作用させることにより、テトラゾリウム塩を発色させます。470 nm 付近で測定することにより、ヒスタミン濃度を定量できます。

*1 1-Methoxy PMS:1-メトキシ-5-メチルフェナジニウム メチルサルフェイト

*2 WST-8:2-(2-メトキシ-4-ニトロフェニル)-3-(4 -ニトロフェニル)-5-(2,4-ジスルホフェニル)-2H-テトラゾリウム-ナトリウム

〔特長〕

1. 抽出操作が簡単で、HPLC 法や AOAC 法*3などのように測定妨害物質を除くための前処理操作が不要です。
2. 本測定法は、HPLC 法のような煩雑な操作は不要です。しかも短時間で精度良くヒスタミンを測定することができます。

*3 AOAC 法:Official Methods of Analysis of AOAC International 掲載の測定法

〔キットの性能〕

1. 特 異 性:本測定法は、試料中に含まれるカダベリン、プトレッシンなど他のアミンの影響を受けません。
2. 測定範囲: 0.4~6 ppm(サンプル換算 10~150 ppm)
〔光路 1cm の吸光度計の場合 0.8~12 ppm
(サンプル換算 20~300 ppm)〕
3. 測定時間:検液調製後、各試薬を分注してから約 20 分

〔キットの構成〕

本製品は以下の試薬より構成されています。

試薬名	主成分	数量
酵 素	ヒスタミンデヒドロゲナーゼ	凍結乾燥品 6 本
発色試薬	WST-8 1-Methoxy PMS	凍結乾燥品 6 本
緩衝液	トリス緩衝液	24 mL 3 本
標準液	ヒスタミン	30 mL 1 本

キットの測定回数について:

本キットは、60 回測定用です。本測定の際には、検体の測定(検液値と検液ブランク値を測定してその差を求めます)に加えて標準の測定(標準値と発色ブランク値を測定してその差を求めます)が必要になります。そのため、1 回に処理する検体の数によって 1 キットで処理可能な検体の数が変化します。

例えば、1 回でキットの試薬を全て使い切る場合には、標準の測定が 1 測定で済みますので、59 検体の処理が可能です。

一方、1 回の測定で 5 検体ずつ処理する場合には、毎回標準の測定が 1 測定加わり 6 測定が必要です。すなわち、測定回数 10 回、処理できる検体数は、 50 検体となります。

〔使用上の注意〕

本製品の性能を充分に活用していただくため、以下の点にご注意下さい。

①品質保持期限が切れた製品は使用しないで下さい。測定が正確に行えないおそれがあります(品質保持期限は外箱に記載してあります)。

②異なるロットの試薬を混合して使用しないで下さい。測定が正確に行えないおそれがあります。

③検体の調製では、微生物汚染に充分注意し、速やかに行って下さい。また、検体の腐敗を防ぐため検体をすりつぶす工程、加熱抽出後の工程は、検体を必ず冷却(0~10℃)して下さい。

④検体の加熱では、検体の突沸および加熱された容器による火傷等には充分注意して下さい。

⑤抽出した検体を濾紙で濾過する場合、濾過に 5 分以上かかる時は濾紙を交換して下さい。また脂肪分が多い検体については、濾液を集める前に抽出した液を充分冷やして下さい。

⑥直ちに検液を測定しない場合は凍結して下さい。凍結融解は、1 回を限度としてください。また、検液を解凍する場合、10℃以下で行って下さい。さらに、解凍中は微生物の汚染には充分注意してください。

⑦試薬の反応の時間は必ず遵守して下さい。測定が正確に行えないおそれがあります。

⑧標準液の蓋の開け閉めは速やかに行い、液の蒸発には充分注意して下さい。

〔測定に使用する推奨機器〕

・吸光度計 B 型式 ABS-B 470
(発売元:株式会社共立理化学研究所)
・カラーテスター PD470 (販売終了)
または、分光光度計*4(470 nm 付近が測定できるもの)

*4 光路 1cm の吸光度計の場合マイクロセルをご使用ください。

〔キット以外に必要な器具〕

注意:ヒスタミンはガラスに吸着することがあります。ご使用になる器具はプラスチック製のものをご使用ください。

検体を小片化するもの(粉砕機、乳鉢、あるいはホモジナイザー等)、耐熱性コニカルチューブ(50 mL 容、キャップ付で密閉性

のよいもの)、薬さじなど、ピペット(0.5 mL が量れるもの)、遠心機と遠心チューブ、あるいは濾紙(No.5C 濾紙)と漏斗、加熱装置(ガスコンロなど沸騰水を作ることができるもの)、秤(1 g が量れるもの)、恒温槽(37℃に設定できるもの)、プラスチック製小試験管(約 10 mL 容)、アイスバス

〔キット以外に必要な試薬〕

1. 蒸留水
2. 0.1 M EDTA･ナトリウム水溶液(pH 8):抽出用溶液
3. 市販の 0.5 M EDTA 溶液(pH 8)の 5 倍希釈液も抽出用溶液としてお使いいただけます。

(抽出用溶液の調製法)

EDTA2 ナトリウム 2 水和物 37.2 g はかりとり、1L 容器に入れる。蒸留水を加えて液量を約 750 mL に合わせる。撹拌子(1L 用)をいれて良く混合する。水酸化カリウム水溶液、または水酸化ナトリウム水溶液で上記溶液を pH 8.0 に合わせる。pH は、撹拌を止めた状態で合わせる。これを 1L メスシリンダーに移し蒸留水で 1L にメスアップする。調製後はきれいな容器に移し替え室温で保存する。

〔測 定〕

1. 検液の調製

1)検体を 10 g 程度採取し、粉砕機等を用い細かくすりつぶします。ここから正確に 1 g 秤量し、50 mL 容のコニカルチューブに入れます。
2)これに抽出用溶液を正確に 24 mL 加え、コニカルチューブのふたをしっかりしめ、沸騰水中で 20 分間加熱します(検体は、抽出用溶液を加えたことにより 25 倍に希釈されます)。
3)検体の入ったコニカルチューブを氷中で冷却します。
4)冷却後、検体をきれいなスパーテル等を用いて細かくほぐします。
5)氷中で静置させ固形物質と液体を分離させます。
6)5)を濾紙(No.5C)で濾過または、遠心分離(10,000×g、5 分間)し、上清を集め、検液とします。

2. 試薬の調製

(発色試薬液)

発色試薬は凍結乾燥後、陰圧下で封栓してあります。内容物が飛散しないようにゆっくりとゴム栓を持ち上げ、切り込み部分から空気を入れるようにして開栓して下さい。開栓した発色試薬 1 瓶(10 回測定分)に 11 mL の蒸留水を加え、泡立たない程度に撹拌して溶解して下さい。調製後必ず冷却(0～10℃)して下さい。溶解した発色試薬液は、一度で使い切ることをお勧めします。

やむを得ず保存する場合は、冷蔵(2～8℃)または凍結(-10℃以下)して下さい。保存期間は、冷蔵(2～8℃)で 1 週間、凍結(-10℃以下)で 1 ヶ月間、凍結融解は 3 回を限度として下さい。なお、解凍する際は流水中で素早く行い、解凍後必ず冷却(0～10℃)して下さい。また発色試薬液は光(特に自然光)に敏感に反応します。取扱いの際には、測定場所に自然光が入らぬようブラインド等で遮光して下さい。

(酵素液)

酵素は凍結乾燥後、陰圧下で封栓してあります。内容物が飛散しないようにゆっくりとゴム栓を持ち上げ、切り込み部分から空気を入れるようにして開栓して下さい。開栓した酵素 1 瓶(10 回測定分)に 6 mL の緩衝液を加え、泡立たない程度に撹拌して溶解して下さい。調製後必ず冷却(0～10℃)して下さい。室温に放置すると測定が正確に行えないおそれがあります。

溶解した酵素液は、一度で使い切ることをお勧めします。やむを得ず保存する場合は、凍結(-10℃以下)して下さい。凍結による保存期間は 1 ヶ月間、凍結融解は 3 回を限度として下さい。なお、解凍する際は流水中で素早く行い、解凍後必ず冷却(0～10℃)して下さい。

3. 測 定

注意:

・検液と標準の測定は、必ず同時に行ってください。

・混合試薬は光に敏感に反応します。加温中は必ず遮光してください。

1)測定器のゼロ点調整は蒸留水で行って下さい。ゼロ点調整は測定器の取扱い説明書の方法に従って行って下さい。
2)小試験管を用意します。1 検液測定するには、2 本(検液値と検液ブランク値を測定します)試験管が必要になります。また、1 回の測定に標準値を測定するため 2 本(標準値と発色ブランク値を測定します)試験管が必要になります。したがって、1 回の測定で 1 検液処理するのに試験管 4 本が必要となります。1 回の測定で 2 検液処理するには試験管 6 本、1 回の測定で N 検液処理するには(2N＋2)本それぞれ必要になります。
3)検液値(ES)の測定として、小試験管に検液、発色試薬液、酵素液をそれぞれ 0.5 mL ずつ入れ、良く混合し、37℃で 15 分間加温し反応させます。上記混合試薬は光に敏感に反応します。加温中は必ず遮光してください。 反応後、この反応終了液を吸光度測定用セルに入れ、470 nm 付近の波長で吸光度を測定します[*5]。

 *5 検液値(Es)が 1.0 を越えた場合は、検液値(Es)が 0.1～1.0 の範囲に入るように、検液を蒸留水にて適宜希釈して再測定(3.測定 1)～4)の操作)をして下さい。

4)検液ブランク値(Eb)の測定は、2)で加える酵素液の代わりに緩衝液を用います。以下 2)と同様の操作を行い吸光度を測定します。
5)標準値(Estd)の測定は、2)で加える検液の代わりにキットに添付されている標準液を用います。以下 2)と同様の操作を行い、吸光度を測定します。Estd 値は吸光度計 B(または、カラーテスター PD470)を使用した場合 0.85 前後を示します。(セル幅 1 cm の吸光度計の場合 0.5 前後となります。)Estd 値がこの範囲外の場合は、操作手順を確認し、再試験を実施して下さい。
6)発色ブランク値(Ec)の測定は、2)で加える検液の代わりに蒸留水、酵素液の代わりに緩衝液を用います。以下 2)と同様の操作を行い、吸光度を測定します。Ec 値は吸光度計 B(または、カラーテスター PD470)を使用した場合＜0.10 (セル幅 1 cm の吸光度計の場合 ＜0.05)を示します。Ec 値がこの範囲外の場合は、操作手順を確認し、再試験を実施して下さい。

吸光度測定条件

波長 : 470 nm 付近
最終液量 : 1.5 mL

測定操作

	検液値	検液ブランク値	標準値	発色ブランク値
検液(mL)	0.5	0.5	―	―
標準液(mL)	―	―	0.5	―
蒸留水(mL)	―	―	―	0.5
発色試薬液(mL)	0.5	0.5	0.5	0.5
酵素液(mL)	0.5	―	0.5	―
緩衝液(mL)	―	0.5	―	0.5
	Es	Eb	Estd	Ec

数字は添加量(mL) ― は、無添加を表す。

4. データの取扱い

検体中ヒスタミン量の計算方法は以下の通りです。

検体中のヒスタミン量 (mg/L = ppm)

＝(Es－Eb)÷(Estd－Ec)×4×25×df *6

*6 検液を希釈しない場合は、df＝1 となります。

但し、Es:検液値、Eb:検液ブランク値、Estd:標準値、Ec:発色ブランク値、df:検液の希釈倍率。なお、式中の 4 は、標準液のヒスタミン濃度が 4 ppm であること、25 は検体が予め抽出時に 25 倍に希釈されていることによる希釈倍率をあらわします。

〔添加回収試験の方法 〕

本キットは、生魚用です。味付けされた加工品、発酵食品等では、正確な測定ができません。ただし、一部(水煮、オイル漬缶詰等)測定できる検体もあります。生魚以外の検体を測定する場合には、下記の添加回収試験をおこない測定可能な検体であるか確認をおこなってください。

1. 添加用ヒスタミン溶液(1000 ppm)の調製

ヒスタミン二塩酸塩をデシケーター(加熱式でないもの)の中で2 時間乾燥させます。乾燥後、0.167 g を精秤し、0.1 N 塩酸に溶解し 100 mL とします。

2. 検液の調製

1)検体 10 g 程度を採取し、粉砕機等を用い細かくすりつぶします。
2)2本のコニカルチューブ(A・B)を用意し、すりつぶした検体を正確に 1 g ずつ秤量し、それぞれのチューブに入れ、検体A、検体Bとします。
3)チューブ(検体A)に 1000 ppm ヒスタミン標準液 0.1 mL を、チューブ(検体B)に蒸留水 0.1 mL を加えます。(検体Aには 100 ppm のヒスタミンが添加されたことになります)
4)検体A・Bにそれぞれ正確に抽出用溶液 24 mL を加え、コニカルチューブのふたをしっかりしめ、沸騰水中で 20 分間加熱します。(検体A・Bは抽出用溶液を加えたことにより 25倍に希釈されます)
5)検体A・Bの入ったコニカルチューブを氷中で冷却します。
6)冷却後、検体をきれいなスパーテル等を用いて細かくほぐします。
7)氷中で静置させ固形物質と液体を分離させます。
8)7)を濾紙(No. 5C)で濾過、または、遠心分離(10,000 × g , 5 分間)し上清を集め、それぞれ検液A・検液Bとします。

3. 測 定

「〔測 定〕 3.測定」 に従って検液A・Bそれぞれのヒスタミン量を測定します。各検体につき、3回ずつ測定を行い、平均値を取ることをお勧めします。

4. 検定

「〔測 定〕 4. データの取扱い 」に従って検体A・Bのヒスタミン量を算出します。添加回収率の計算方法は、以下の通りです。なお、Aは、検体A中のヒスタミン量 (ppm)を、Bは、検体B中のヒスタミン量 (ppm)をあらわします。

添加回収率 (%) =(A － B)÷100 *7×100 (%)

*7 添加したヒスタミン量 (ppm)

〔廃棄の方法〕

発色試薬および酵素の容器は、ガラス、ゴム、アルミの材質からなっています。緩衝液および標準液の容器は、本体がポリエチレン製、キャップがポリプロピレン製です。廃棄の際は各々を分別して、都道府県・市町村が定める廃棄物の適正処理に従って廃棄処理して下さい。

〔取扱い上の注意〕

本製品を安全にご使用いただくため、以下の点にご注意下さい。

①本測定法は公定法ではありません。本製品を自主衛生検査以外の目的には使用しないで下さい。
②本製品は簡易迅速検査用キットです。必要に応じて従来法(食品衛生検査指針記載の方法など)を併用して下さい。
③本製品の試薬類を使用前後に口に入れたり、直接手で触れたり、眼に入れたりしないで下さい。
④使用後の器具を洗浄する際は、手袋を使用して下さい。
⑤誤って飲み込んだり、眼に入った場合は、口や眼を水にて良く(15 分間)すすいだ後、直ちに医師に連絡を取り診察を受けて下さい。手に付いた場合は、水で良く洗浄して下さい。
⑥食品類への混入がないよう充分ご注意下さい。廃液処理の際は、地下水及び上水道へ混入しないよう注意して下さい。
⑦ヒスタミンは有毒な物質であるため、眼に入れたり、吸入、経口摂取、皮膚への付着が生じないようにし充分取扱いには注意して下さい。また、本キット以外の試薬と混合しないで下さい、毒性ガスが発生する場合があります。
⑧取扱い説明書に記載されている所定以外の方法で使用しないでください。特に独自に試薬類を希釈したり、所定量以上混合することは避けて下さい。
⑨本製品は幼児の手の届かないところに保管して下さい。

〔保存方法〕

1. キットの保存:冷暗所(2～8℃)で保存。
2. 品質保持期限:本キットの外箱に記載。

〔保証〕

製造元では、本製品が所期の品質を有することおよび、本製品に不具合があった場合代替の製品を提供することを保証しますが、それ以外の保証は致しません。製造元は、特別な若しくは結果として生じる損害または、本製品の使用から直接的または間接的に生じる費用を含むいかなる損害にも責任は負いません。

製造元 **キッコーマンバイオケミファ株式会社**
〒105-0003 東京都港区西新橋 2-1-1
Tel: 03-5521-5490 Fax: 03-5521-5498
E-mail: biochemifa@mail.kikkoman.co.jp
URL: http://biochemifa.kikkoman.co.jp/